

Doc. No 149. EP 0052322

**Method of preparing lipid vesicles by ultrasonic treatment, the use of this method and apparatus for its application.**

Patent Number: EP0052322  
Publication date: 1982-05-26  
Inventor(s): SCHAL WILFRIED DR; GERSONDE KLAUS PROF DR MED  
Applicant(s): GERSONDE KLAUS PROF DR (DE)  
Requested Patent: ☐ EP0052322, A3, B1  
Application Number: EP19810109575 19811109  
Priority Number(s): DE19803042360 19801110  
IPC Classification: A61K9/50  
EC Classification: A61K9/127P, A61K9/50H8B  
Equivalents:  
Cited patent(s): DE2338503

**Abstract**

1. A method of preparing lipid vesicles from biological membranes or lipid suspensions, in which the lipid suspensions or lipid particles to be desintegrated are ultrasonically treated in a dispersion fluid inside a treatment container at a substantially constant temperature, characterized in that the size respectively size distribution of the lipid vesicles, effective for the desired purpose, and the optimum ultrasonic frequency and intensity in the dispersion fluid required for obtaining this size respectively this size distribution are determined, and that the thus determined optimum ultrasonic frequency and intensity, with the other constant conditions, are maintained constant in such a manner that during the ultrasonic treatment the actual value of frequency and intensity of the ultrasonic field in the reaction medium is continuously measured and the output power and the frequency of the electric generator supplying the sound transmitter are controlled in dependence upon the actual value of the frequency and intensity of the ultrasonic field.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der piezoelektrische Schallaufnehmer am Boden des Reaktionsgefäßes so angeordnet wird, daß die Richtung seiner höchsten Empfindlichkeit gegen den Ultraschallgeber gerichtet ist, während der Ultraschallgeber in das obere Drittel des Mediums eintaucht.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium unter einer Inertgasatmosphäre behandelt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsmedium sterilisiert und in einem Steril-Beutel eingeschlossen, und der das Reaktionsmedium enthaltende Steril-Beutel innerhalb einer dem Ultraschallfeld ausgesetzten Flüssigkeit behandelt wird.

7. Anwendung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von für therapeutische Zwecke bestimmten, mit einem Wirkstoff wie Inositolhexaphosphat beladenen, zur Fusion mit roten Blutzellen befähigten Lipid-Vesikeln.

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, mit einem die Reaktionsflüssigkeit aufnehmenden Behandlungsgefäß und mindestens einem von einem elektrischen Generator gespeisten elektroakustischen Wandler zur Erzeugung eines Ultraschallfeldes in dem Reaktionsmedium, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb des Behandlungsgefäßes (3; 30) als Schallaufnehmer ein akustisch-elektrischer Wandler (18; 37) angeordnet ist, dessen Ausgangssignal zur Regelung der Ultraschall-Intensität und -Frequenz in der Reaktionsflüssigkeit dient.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch einen den elektrischen Generator (23; 43) ansteuernden Regelverstärker (21; 39) mit Sollwert-Istwert-Vergleich.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß der akustisch-elektrische Wandler (18; 37) aus einer am Ende eines Rohres angeordneten Piezo-Scheibe besteht, die mit ihrer gegen Schalldruck empfindlichsten Richtung gegen den Schwingungsgeber gerichtet ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Geometrie des Ultraschallgebers und des das Medium aufnehmenden Behandlungsgefäßes (3; 30) so gewählt sind, daß die durch Reflexion verursachte Bildung von Ultraschallwellen mit einer von der Sollfrequenz abweichenden Frequenz und/oder mit gegenüber den primären Ultraschallwellen verschobener Phase in dem beschallten Medium vermieden wird.

12. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3; 30) von einer Kühlflüssigkeit durchströmte Doppelwände aufweist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Behandlungsgefäß (3) gegen die Außenatmosphäre abgeschlos-

sen ist und eine Zuleitung (13) für die Zufuhr von Inertgas zu dem Gasraum oberhalb des beschallten Reaktionsmediums (1) aufweist.

## Claims

1. A method of preparing lipid vesicles from biological membranes or lipid suspensions, in which the lipid suspensions or lipid particles to be desintegrated are ultrasonically treated in a dispersion fluid inside a treatment container at a substantially constant temperature, characterized in that the size respectively size distribution of the lipid vesicles, effective for the desired purpose, and the optimum ultrasonic frequency and intensity in the dispersion fluid required for obtaining this size respectively this size distribution are determined, and that the thus determined optimum ultrasonic frequency and intensity, with the other constant conditions, are maintained constant in such a manner that during the ultrasonic treatment the actual value of frequency and intensity of the ultrasonic field in the reaction medium is continuously measured and the output power and the frequency of the electric generator supplying the sound transmitter are controlled in dependence upon the actual value of the frequency and intensity of the ultrasonic field.

2. A method as defined in claim 1, characterized in that control of the generator supplying the ultrasonic transmitter is realised by means of an automatic control circuit including an actual value — nominal value comparator.

3. A method as defined in claim 1 or 2, characterized in that a piezoelectric sound receiver dipped in the reaction medium is used for measuring the ultrasonic intensity and frequency.

4. A method as defined in claim 3, characterized in that the piezoelectric sound receiver is arranged on the bottom of the reaction container so that its direction of the maximum sensitivity is directed against the ultrasound transmitter, the ultrasound transmitter being dipped into the upper third of the reaction medium.

5. A method as defined in a or more of the claims 1 to 4, characterized in that the reaction medium is treated under an inert gas atmosphere.

6. A method as defined in one or more of the claims 1 to 5, characterized in that the reaction medium is sterilised and enclosed in a sterile bag, and that the sterile bag with the reaction medium inside is treated within a fluid exposed to the ultrasonic field.

7. Application of a method as defined in one or more of the claims 1 to 6 for producing lipid vesicles for therapeutical purposes loaded with an effective substance such as inositolhexaphosphate and capable of fusing with red blood cells.

8. An apparatus for carrying-out the method as defined in claim 1, comprising a treatment container including the reaction fluid and at least one electric-acoustic, by an electric generator

supplied transmitter for producing an ultrasonic field in the reaction medium, characterized in that as a sound receiver an acoustic-electric transducer (18; 37) is arranged within the treatment container (3; 30), the output signal of said transducer being used for controlling the ultrasonic intensity and frequency in the reaction fluid.

9. An apparatus as defined in claim 8, characterized by an control-amplifier (21; 39) including nominal value — actual value comparator, the amplifier (21; 39) being connected with the electric generator (23; 43).

10. An apparatus as defined in claim 8 and 9, characterized in that the acoustic-electric transducer (18; 37) is composed of a piezoelectric disk arranged at the end of a tube so that its most sound-sensitive direction faces against the sound generating means.

11. Apparatus as defined in claim 8 to 10, characterized in that the ultrasound generating means and the treatment container (3; 30) including the medium have geometries which are selected so as to avoid a reflection-caused formation of ultrasonic waves in the medium with a frequency deviating from the nominal frequency and/or with a phase which is offset relative to the phase of the primary ultrasonic waves in the medium.

12. Apparatus as defined in claim 8 to 11, characterized in that the treatment container (3; 30) has double walls with hollow spaces therein through which runs a cooling medium.

13. Apparatus as defined in claim 8 to 12, characterized in that the treatment container (3) is closed from the outer atmosphere and comprises inlet means (13) for supplying an inert gas into the gas-filled space above the reaction medium.

#### Revendications

1. Procédé pour préparer des vésicules lipidiques à partir de membranes biologiques ou de suspensions lipidiques, dans lequel les suspensions ou particules lipidiques à désintégrer sont soumises à un traitement aux ultra-sons dans un liquide de dispersion à l'intérieur d'un récipient à une température essentiellement constante, caractérisé en ce qu'on détermine, dans le liquide de dispersion, la fréquence et l'intensité optimales d'ultra-son pour obtenir la dimension respectivement la répartition des dimensions des vésicules effectives pour le but souhaité, et qu'on maintient constantes la fréquence et l'intensité d'ultra-son optimales ainsi trouvées, les autres conditions de traitement étant les mêmes, en mesurant continuellement la valeur effective de la fréquence et de l'intensité du champ ultrasonique dans le milieu de réaction, et en réglant la puissance de sortie et la fréquence du générateur électrique alimentant le générateur des ultra-sons en dépendance de ladite valeur effective.

2. Procédé selon revendication 1, caractérisé

en ce qu'on règle le générateur alimentant le générateur d'ultra-sons à l'aide d'un circuit de réglage automatique à comparaison valeur de consigne — valeur effective.

3. Procédé selon revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise un capteur piézoélectrique de son plongé dans le liquide de réaction, pour mesurer l'intensité et la fréquence des ultra-sons.

4. Procédé selon revendication 3, caractérisé en ce que le capteur piézoélectrique de son est placé au sol du récipient de réaction de telle manière que la direction de sa sensibilité la plus élevée est dirigée vers le générateur des ultra-son, ce dernier étant plongé dans le tiers supérieur du milieu.

5. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le milieu de réaction est traité dans une atmosphère de gaz inerte.

6. Procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le milieu de réaction est stérilisé et enfermé dans un sac stérile, et que le sac stérile contenant le milieu de réaction est traité à l'intérieur d'un liquide exposé au champ des ultra-sons.

7. Application du procédé selon une ou plusieurs des revendications 1 à 6 pour préparer des vésicules lipidiques destinées aux buts thérapeutiques, chargées d'un médicament comme inositolhexaphosphat et susceptibles à la fusion avec des globules rouges du sang.

8. Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon revendication 1, comprenant un récipient pour le liquide de réaction et au moins un transducteur électroacoustique alimenté par un générateur électrique, pour créer un champ des ultra-sons dans le milieu de réaction, caractérisé en ce qu'un capteur acoustique-électrique (18; 37) est disposé à l'intérieur du récipient de réaction (3; 30), le signal de sortie dudit capteur (18; 37) servant de régler l'intensité et la fréquence des ultra-sons dans le liquide de réaction.

9. Dispositif selon revendication 8, caractérisé par un amplificateur de réglage (21; 39) à comparaison valeur de consigne — valeur effective, l'amplificateur de réglage étant lié au générateur électrique (23; 43).

10. Dispositif selon revendication 8 et 9, caractérisé en ce que le capteur acoustique-électrique (18; 37) consiste en une piézo-disque disposée à l'extrémité d'un tube, la direction la plus sensible à la pression des sons étant dirigée vers le générateur des vibrations.

11. Dispositif selon revendication 8 à 10, caractérisé en ce que la géométrie du générateur des ultra-sons ainsi que la géométrie du récipient de traitement (3; 30) contenant le milieu sont choisies de telle sorte que la formation, à la suite de réflexions, d'ondes ultrasoniques ayant une fréquence différente de la fréquence de consigne et/ou une phase déviée vis-à-vis de la phase des ondes ultrasoniques primaires, soit évitée dans le milieu exposé aux ultra-sons.